

# DHS リアクターにおいて塩分濃度変化した際の硝化特性評価

長岡技術科学大学 (非) ○赤嶺拓海 (正) 渡利高大 (正) 幡本将史 (正) 山口隆司

## 1. はじめに

近年、地球温暖化の影響により海洋で漁獲される魚介類が減少している。そこで、立地条件の制約がなく山間部や砂漠地帯で持続的な食糧生産が可能な閉鎖式循環型陸上養殖 (RAS) による生産が注目されている。RAS を行う上で重要な水質指標は、全アンモニア態窒素 (TAN), 亜硝酸態窒素 ( $\text{NO}_2^-$ -N), 硝酸態窒素 ( $\text{NO}_3^-$ -N) であり管理が必要である。我々の研究グループでは、RAS の水質処理システムとして、Down-flow hanging sponge (DHS) リアクターを用いた技術開発を行ってきた。DHS リアクターは、水がスポンジ担体表面を流下する際に、酸素を取り込むためスポンジ内の硝化細菌により硝化反応が可能になる。また、溶存酸素供給性能を保有していることから、水槽内への曝気が不要であるため低コストでの運転が期待できる。しかし、水処理装置の流入水が海水の場合、淡水より硝化反応を有するスタートアップ期間が長いという課題を持つ<sup>1)</sup>ため海水 RAS の初期水質管理は困難である。本研究では、海水を用いた DHS リアクターの簡易的スタートアップ手段確立を目的として淡水 RAS で使用した DHS リアクターに海水を流入させて連続運転を行い、硝化特性評価と微生物群集構造の変化を調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 DHS リアクター運転条件

DHS リアクターは容積約 40 L の槽にスポンジ担体 (DHS G3:φ33 mm×33 mm) を 700 個 (20 L) 充填した (上層 10 L, 下層 10 L の計 20 L)。スポンジ担体は、ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) RAS で利用されたものを使用した。実験に供した大型水槽は、約 5000 L 容水槽とし、水槽内には人工海水 2000 L (マリンアート, 富田製薬) を使用して塩分濃度 23 - 27‰ に調製した。運転開始から 20 日目までは HRT1.8 min で運転を行い 21 日目以降は HRT3.75 min に移行し運転を行った。水槽内の窒素源として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (和光純薬) をアンモニア濃度が  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  になるように添加した。また、pH が

7.0 未満の場合に、pH 調整のため  $\text{NaHCO}_3$  (和光純薬) を  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  添加した。

測定項目は、pH, DO, 塩分濃度, 水温, TAN,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N とし、大型水槽内 (Tank), DHS リアクターの流入 (Inf.), 流出 (Eff.) からサンプルを毎日採取した。

### 2.3 16SrRNA 遺伝子に基づいた微生物群集構造解析

DHS リアクター内の上下層の中央付近からそれぞれ採取したスポンジ担体について 16SrRNA 遺伝子を対象とした微生物群集構造解析を行った。DNA 抽出は、QIAcube Connect を用いて DNeasy PowerSoil Pro - Soil - IRT に準じて行った。PCR による増幅は Univ.515F - 806R のプライマーペアを用いて  $95^\circ\text{C} : 3\text{min}$ , [ $95^\circ\text{C} : 45\text{s}$ ,  $50^\circ\text{C} : 1\text{min}$ ,  $72^\circ\text{C} : 1.5\text{min}$ ]×25 サイクル,  $72^\circ\text{C} : 10\text{min}$  の条件で行った。PCR 増幅産物は、DNA 抽出同様 QIAcube Connect を用いて、Cleanup - QIAquick PCR - Amplification reactions - Standard に準じて精製した。その後、iSeq 100 (イルミナ社) により塩基配列を取得し、QIIME2 により解析した。

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 DHS リアクター窒素除去性能

実験期間中、pH は  $7.4 \pm 0.5$ , DO は  $8.3 \pm 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  及び水温は  $20.9 \pm 1.7^\circ\text{C}$  に保たれた。

TAN,  $\text{NO}_2^-$ -N,  $\text{NO}_3^-$ -N の経時変化を図-1 に示す。TAN は、運転開始 1 週間程度で減少傾向を示し、11 日目の Tank の TAN 濃度が  $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  を示した。そのため、硝化反応を持続させるために窒素源を運転初期条件と同様の量を新たに添加した。一方、 $\text{NO}_2^-$ -N は運転開始から 21 日まで増加傾向を示したが、HRT 変更後から運転終了時まで減少傾向を示した。運転 20 日目までは、亜硝酸酸化細菌 (NOB) の増殖速度がアンモニア酸化細菌より遅いため、 $\text{NO}_2^-$ -N が  $\text{NO}_3^-$ -N へ変換されず蓄積したことが示唆される。しかし、21 日目以降は、NOB が増殖され、硝化反応が起きたことが推察され

る。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N は、運転開始から増加傾向を示し、実験最終日の Tank は、64.9 mg・L<sup>-1</sup> を示した。以上の結果より、淡水 RAS で使用したスポンジ担体に海水を流入しても完全硝化反応が起こることが確認された。

### 3.2 微生物叢解析結果

門レベルで検出された各サンプル上位 10 種を図-2 に示す。全てのサンプルで Proteobacteria, Planctomycetota が検出された。Proteobacteria は、海水環境において優占門であり<sup>2)</sup>、Planctomycetota は、アナモックス細菌が属し、海洋の窒素循環に重要な役割を持つことが報告されている<sup>3)</sup>。運転開始 21 日目に NOB が属す Nitrospirota が検出され、運転最終日に、存在割合が上下層平均 10.0 % まで増加した。これらから、海水環境の硝化反応に関わる微生物の増殖が示唆された。次に、属レベルで 1.0 % 以上存在した硝化菌の割合を図-3 に示す。運転 0 日目で、アンモニア酸化古細菌 (AOA) である *Candidatus\_Nitrocosmicus* が検出され、運転最終日まで 15.0 % 以上の存在割合を示した。運転 21 日目には、NOB である *Nitrospira* が検出され、運転最終日に、リアクター内の上下層平均 10.0 % の存在割合を示した。*Nitrospira* は淡水より海水の方が増殖に有利であるため<sup>4)</sup>、存在割合が増加したと考えられる。以上の結果より、DHS リアクター内の微生物群集は時間経過と共に、海水内での硝化反応に有意な微生物群へと変化したことが推察される。

### 4. 結論

本研究では、淡水 RAS で使用した DHS リアクターに海水を流入させて連続運転を行った。その結果、十分な水処理性能が明らかとなった。本研究より、淡水魚から海水魚への DHS リアクターを用いた RAS システムの移行が簡単になることが示唆された。

### 参考文献

- 1) Zhang W et al. *Science of The Total Environment*, 878, 162870 (2023)
- 2) Pan Z et al. *Bioresource Technology*, 301, 122726 (2020)
- 3) Fuerst J. A *Microbial resources*, Academic Press (2017)
- 4) Keuter S et al. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2536-2547 (2011)

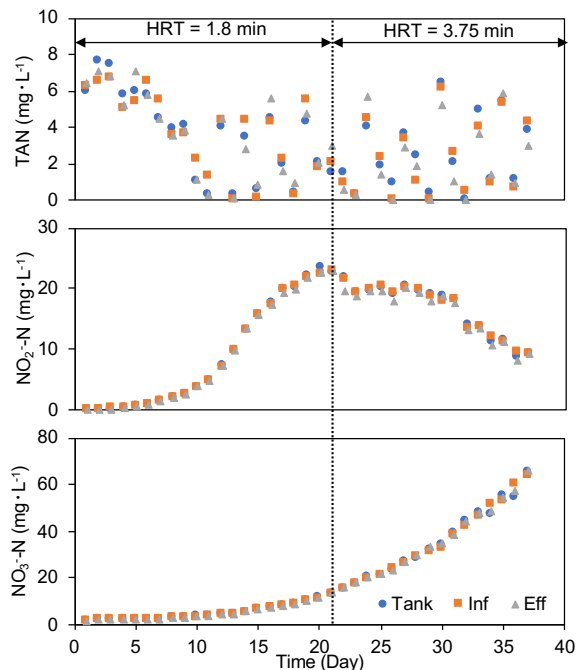


図-1 各濃度の経過時間変化

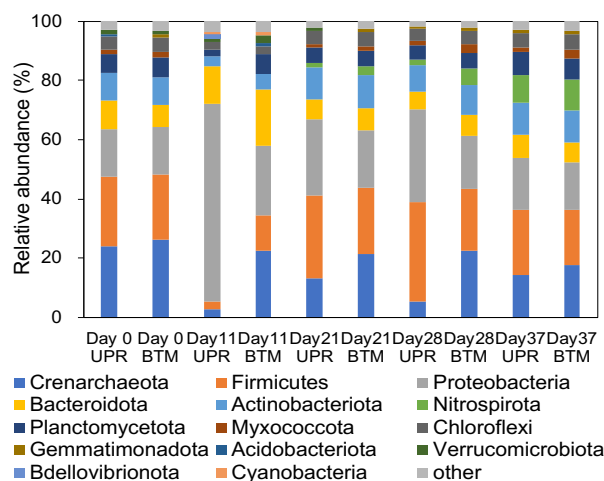


図-2 微生物叢解析結果 (門レベル)

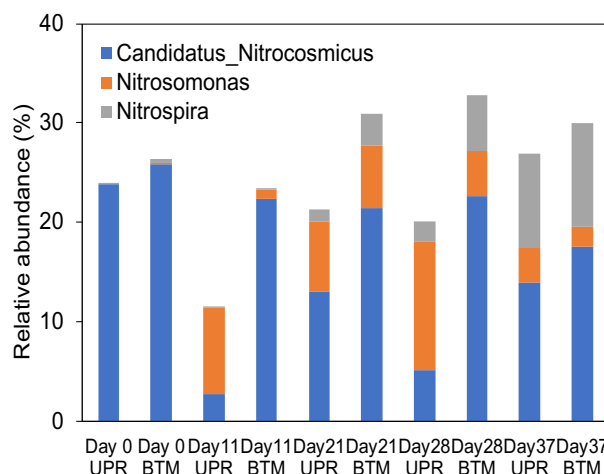


図-3 微生物叢解析結果 (属レベル)